

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Odontología
Master Oficial en Ciencias Odontológicas

**Influencia del ambiente sobre la capacidad de
diferenciación de las células madre mesenquimales**



Trabajo de fin de master
Alumna: Silvia Muñoz Semidei
Tutor: Dr. Luis Blanco Jerez

Septiembre 2012

Índice

1. Introducción.....	4
2. Ingeniería Tisular.....	5
3. Células madre.....	8
3.1. Células madre embrionarias.....	9
3.2. Células madre mesenquimales.....	10
3.2.1. Mecanismo de acción de las células madre mesenquimales.....	12
3.2.2. Células madre mesenquimales procedentes de explante óseo.....	12
3.2.3. Células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo.....	13
3.2.4. Células madre mesenquimales procedentes de cordón umbilical.....	14
3.2.5. Células madre mesenquimales procedentes de pulpa adulta.....	15
3.2.6. Células madre mesenquimales procedentes de pulpa temporal.....	16
4. Diferenciación celular.....	17
4.1. Marcadores de diferenciación osteoblástica.....	19
4.2. Métodos para la identificación celular.....	20
5. Alternativas para obtener la diferenciación	22
5.1. Cultivo en medios condicionados.....	22
5.2. Co-cultivo celular.....	23
6. Hipótesis.....	25
7. Objetivo general.....	25
7.1. Objetivos específicos.....	25
8. Materiales y métodos.....	26
8.1. Aislamiento y cultivo de las células madre mesenquimales (MSC).....	28
8.2. Cultivo de células diferenciadas y obtención del medio condicionado.....	32

8.2.1. Cultivo de células madre en medio condicionado.....	33
8.3. Co-cultivo celular de MSC con osteoblastos.....	35
8.4. Determinación de marcadores de actividad osteoblástica.....	36
9. Resultados.....	38
9.1. Fosfatasa alcalina.....	39
9.2. Hidroxiapatita.....	44
10. Discusión.....	45
11. Conclusión.....	49
12. Bibliografía.....	50

1. Introducción

A la largo de la historia de la ciencia se han buscado distintos métodos y formas alternativas para tratar de regenerar y mejorar las funciones ausentes o pérdidas de los tejidos y órganos del cuerpo humano.

Tradicionalmente los defectos óseos se han tratado colocando tejidos autógenos, alógenos y xenógenos o implantando materiales sustitutos como compuestos aloplásticos, fosfatos tricálcicos e hidroxiapatita (Logeart, 2005). La implantación de materiales de injerto óseo conlleva una tasa de fracaso de más del 30% debido a la pobre oseointegración del injerto; generalmente requiere una segunda intervención quirúrgica que aumenta los gastos en salud relacionados y produce una insuficiente curación ósea, por lo tanto es un desafiante problema socioeconómico y se hace necesaria la búsqueda de soluciones alternativas (Stiehler et al, 2010). A causa de dificultades como la escasez de donantes, la transmisión de enfermedades, la morbilidad del sitio de extracción y la incapacidad de los materiales para remodelarse y reaccionar ante condiciones fisiológicas, ninguno de los tratamientos convencionales ha podido suplir todas las necesidades a la hora de tratar problemas relacionados con la pérdida o deterioro los huesos (Salgado et al., 2004) (Stiehler et al., 2010).

2. Ingeniería tisular

La ingeniería tisular es un campo multidisciplinario que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que pueden restaurar, mantener y mejorar la función de los tejidos. Los elementos esenciales de la ingeniería de tejidos son los factores de crecimiento, las células madre y las matrices extracelulares que constituyen el microambiente para su crecimiento (Shehab, 2009).

En medicina regenerativa se han empleado biomateriales inertes con el fin de usarlos como sustitutos de algunas partes del cuerpo. Posteriormente con el estudio de propiedades como osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis en regeneración ósea se inició la aplicación de matrices biodegradables o "andamios biológicos" con estructura porosa, trabecular o reticular, que pueden ser sintéticas o naturales (Hernández et al., 2009) (Estrada et al., 2006). Estas matrices biológicas se colocan en el tejido dañado para promover el microambiente apropiado, el crecimiento y propagación *in situ* de las células sanas circundantes o bien de células madre que pueden implantarse en ese tejido o estar incorporadas al biomaterial que integra la matriz, con la finalidad de acelerar la regeneración (Dimitriou et al., 2011) (Hernández et al., 2009) (Astia et al., 2008).

En esta combinación, las células vivas suministran los componentes biológicos, mientras que el material de andamio sirve para apoyar y favorecer la proliferación celular (Nampo et al., 2010). La interacción entre las células y su matriz extracelular juega un papel crucial en la regulación de las funciones celulares (Chan et al., 2011).

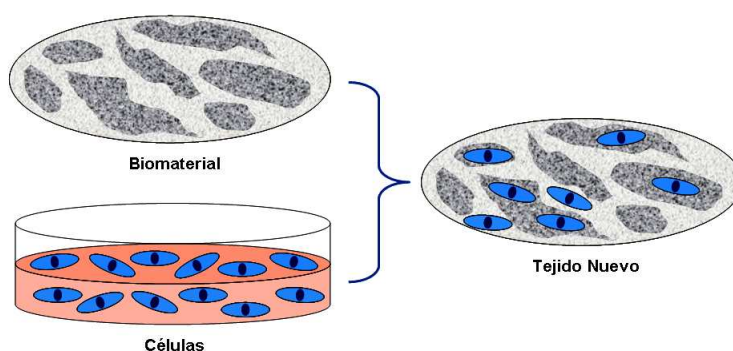


Fig. 1. Herramientas básicas de la ingeniería tisular.

La regeneración tisular puede obtenerse por métodos *in vivo* e *in vitro*. La regeneración *in vivo* puede producirse por dos mecanismos básicos: la dediferenciación de células diferenciadas capaces de multiplicarse y diferenciarse ulteriormente en otras estirpes celulares, y la existencia de células madre que permanecen sin diferenciarse desde la época embrionaria para ser utilizadas posteriormente. Ambos caminos están regulados por moléculas como factores de crecimiento, citoquinas y hormonas (Guerado et al., 2003) (Barradas et al., 2011).

Por su parte, la ingeniería de tejidos *in vitro* comprende la obtención de tejidos en el laboratorio para su posterior implantación en el sitio dañado. Las células ideales para la ingeniería de tejidos deben ser fáciles de obtener y de expandir, conservar el fenotipo, mantener su función y ser multipotenciales para diferenciarse o transdiferenciarse a una variedad de células especializadas, específicas de tejidos u órganos y no deben generar respuestas inmunes (Yang et al., 2001).

Actualmente, el trasplante de células madre adultas es un método muy utilizado en distintas aplicaciones como regeneración cardíaca (Xu et al., 2009) (Barnett et al., 2011), cirugía ortopédica y traumatología (Firriol et al., 2008). Se ha sugerido que la terapia celular permitiría usar predominantemente la capacidad regenerativa del propio organismo con un empleo mínimo de materiales artificiales. Sin embargo, todavía no se conocen bien los mecanismos mediante los cuales las células trasplantadas podrían mejorar o promover la regeneración de los tejidos (Hernández et al., 2009).

Se ha planteado la hipótesis de que factores solubles liberados por las células implantadas pueden desempeñar una acción esencial en la regeneración de los tejidos mediante un mecanismo paracrino que actúa estimulando a las células normales residentes en el sitio afectado. Estos productos solubles pueden también actuar, mediante un proceso autocrino, sobre las propias células trasplantadas que los secretan, modulando su biología y favoreciendo su autorrenovación, proliferación y continuidad de sus funciones (Reinisch et al., 2007).

Así mismo existen varias experiencias que dan un fuerte apoyo a la intervención de mecanismos paracrinós en la regeneración de tejidos. Estudios experimentales han mostrado que la inyección en un sitio lesionado de medio condicionado mediante el cultivo de células madre adultas, puede producir efectos beneficiosos comparables a cuando el tratamiento se hace solo con células madre (Reinisch et al., 2007).

3. Células madre

Las células madre son células no especializadas, que se autorepican por mitosis durante largos periodos de tiempo o por tiempo indefinido, poseen elevada capacidad de proliferación y además tienen la habilidad de diferenciarse a tipos celulares específicos. Por lo tanto, las células madre tienen la característica de transformarse en células diferenciadas que tienen una forma y una función concreta dentro del organismo (García-Gómez, 2010) (Tsai et al., 2011) (Estrela et al., 2011).

La diferenciación es el proceso por el cual estas células se transforman en tipos celulares concretos. Este proceso es el resultado de señales que aparecen tanto en el interior de la célula como en el medio que la rodea. Las señales internas son controladas por genes de la propia célula. Las señales externas incluyen sustancias secretadas por otras células como ciertas moléculas presentes en el entorno y el contacto físico celular (Pittenger et al., 1999).

Dependiendo de su origen, las poblaciones de células madre aisladas también muestran diferencias en su capacidad de proliferación y diferenciación así como en la expresión de antígenos de superficie que pueden ser empleados como marcadores de la estirpe celular concreta (Wagner et al., 2005) (Masías et al., 2010).

Las células madre pueden clasificarse según su potencial de diferenciación en:

A. Células madre totipotenciales: Provenientes del embrión hasta el estadio de mórula, capaces de dar lugar a tipos celulares derivados de las tres capas germinales embrionarias y formar membranas extraembrionarias.

B. Células madre pluripotenciales: Derivan de la masa celular interna del blastocisto, tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de las tres capas embrionarias ectodermo, mesodermo y endodermo.

C. Células madre multipotenciales: Capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares de una manera mucho más limitada que las embrionarias. Entre ellas se encuentran las células madre adultas y un ejemplo de estas son las células mesenquimales.

D. Células unipotenciales: Células ya comprometidas con un linaje celular que poseen una limitada o nula capacidad de auto renovación y sólo se diferencian a un tipo celular determinado (Bianco et al., 2001).



Fig.2. Clasificación de células madre según su potencial de diferenciación.

3.1. Células madre embrionarias

En 1980 los científicos M.J. Evans y M.H. Kaufman establecieron los primeros cultivos de células madre embrionarias. Aunque ya en 1949, J. Hammond había descrito en la revista *Nature* el método para mantener células embrionarias de ratón en cultivo *in vitro*. La mayoría de los primeros estudios con este tipo de células se realizaron con células embrionarias de ratón, donde confirmaron la capacidad de estas células para diferenciarse a cualquier linaje celular durante el desarrollo embrionario, tanto del endodermo como del mesodermo o ectodermo (López, 2009).

A finales de 1998, James Thomson publicaba un trabajo en el que por primera vez se anunciaba la generación de líneas celulares estables a partir de células madre o troncales embrionarias humanas. Las líneas obtenidas tenían la capacidad de auto renovarse y mantenerse indiferenciadas o bien, bajo determinadas condiciones, diferenciarse *in vivo* e *in vitro* a todo tipo de células maduras capaces a priori de sustituir cualquier célula alterada del organismo (Zapata, 2010) (Duplomb et al., 2007).

A la hora de establecer las normas legales de la investigación con células madre embrionarias, algo que está marcando la pauta es la utilización de estas para generar un ser humano, por lo que entramos en un terreno más propio del debate religioso filosófico (López, 2009). El proceso no ha estado exento de tensiones y todavía hay muchos investigadores e instituciones que desconocen que está permitido y que no en este campo. (Zapata, 2010).

3.2. Células madre mesenquimales

Desde los trabajos pioneros de Alexander Friedenstein et al. en los años 60 y 70 se deja al descubierto la potencialidad de las células madre mesenquimales descritas como células fibroblastoides (Friedenstein et al., 1968). Estas observaciones muestran que se pueden diferenciar a distintos tipos celulares incluyendo osteoblastos, fibroblastos, mioblastos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein et al., 1976) (Duplomb et al., 2007). No obstante, numerosos estudios han sugerido que algunas poblaciones de células madre adultas o de tejidos post-natales pueden poseer un potencial de diferenciación que va más allá de los tipos celulares de su tejido de origen o residencia, fenómeno que se ha denominado plasticidad (Bianco et al., 2001) (Lakshmipathy et al., 2005) (Takashima et al., 2007) (Lai et al., 2011).

Las primeras células madre mesenquimales (MSC: Mesenchymal stem cells) se extrajeron de la médula ósea, siendo la fuente más común de obtención de estas células en la actualidad. Los recientes estudios sobre células madre mesenquimales muestran que también se pueden aislar a partir de varios tejidos adultos, como sangre periférica, cordón umbilical, tejido neural y adiposo, músculo, piel, páncreas, hígado, retina y

foliculos pilosos. Asimismo existen estudios donde las células madre mesenquimales se aíslan a partir de distintas partes del órgano dental como extractos de ligamento periodontal, de los ápices y de pulpas de órganos dentarios exfoliados (Angelova et al., 2010) (Alge et al., 2010) (Gronthos et al., 2000). Debido al fácil aislamiento y cultivo de estas células, han sido objeto de estudio e investigaciones en distintos campos de la medicina regenerativa (Gronthos et al., 2002) (Lindroos et al., 2008) (Yan, 2010).

Una forma para aislar MSC de tejidos sólidos es hacer un tratamiento con colagenasas, enzimas capaces de romper las uniones peptídicas en la triple hélice de la molécula de colágeno. De esta forma, las células se liberan del tejido y pueden ser recogidas por medio de lavado y centrifugación. La cantidad de MSC obtenidas por este sistema es superior a otras técnicas y conservan su potencial de diferenciación y las características fenotípicas (Sakaguchi et al., 2004).

Existen varios trabajos que han tratado de identificar una combinación de antígenos que permitan caracterizar a las MSC para así poder aislar poblaciones puras de estas células, y aunque la mayoría de los marcadores son coincidentes en las MSC humanas y las de ratones, hasta el momento no se ha encontrado un perfil antigénico único y característico para estas células (Bobis et al., 2006) (Kolf et al., 2007).

Debido a la falta de marcadores específicos para las células mesenquimales y la heterogeneidad de sus poblaciones, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy) ISCT estableció en 2006 tres criterios mínimos que deben cumplir *in vitro* las células aisladas de tejidos mesenquimales para ser consideradas como células madre:

1. Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar: atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y a 37°C de temperatura.
2. Patrones de expresión de antígenos de superficie específicos: positivas para los antígenos CD105, CD90 y CD73, debiéndolos expresar en el 95% o más de la población celular medida por citometría de flujo, y negativas ($\leq 2\%$ positivas) para los marcadores CD45, CD34, CD14 ó CD11b, CD79 α ó CD19 y HLA-DR.

3. Multipotencialidad demostrable: refiriéndose a la capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico (Dominici et al., 2006) (García-Gómez et al., 2010).

3.2.1. Mecanismo de acción de las células madre mesenquimales

Se ha comprobado que las células madre pueden producir varios elementos solubles que son esenciales para su acción y que incluyen factores que intervienen en la citoprotección, proliferación, diferenciación y migración celular, angiogénesis, respuesta inflamatoria, asentamiento celular y quizás con otras funciones aún no conocidas (Gnecchi et al., 2008).

Se ha sugerido que las señales emitidas por medio de factores liberados por las células, o bien debidas a los contactos que se producen entre las células del tejido y las trasplantadas, son capaces de estimular a estas últimas a su diferenciación en el tipo de célula predominante, lo que permitiría su integración al "nicho" apropiado para su acción regenerativa.

También se ha planteado la posibilidad de que alguno de los estímulos recibidos en el microambiente en que se han colocado, induzca la fusión de las células implantadas con las del tejido en que se han asentado, creando nuevas células con características funcionales que les permiten participar en la regeneración, aunque no parece ser una cantidad significativa (Gnecchi et al., 2008).

3.2.2. Células madre mesenquimales procedentes de explante óseo

Las MSC derivadas de la médula ósea fueron las primeras en aislarse e identificarse, siendo ésta la fuente más común de células mesenquimales hasta la actualidad (Payushina et al., 2006). El método clásico de aislamiento se basa en su capacidad para adherirse al frasco de cultivo. Las células no adherentes que permanecen

en suspensión, como las células hematopoyéticas, se eliminan al cambiar el medio de cultivo.

Este tipo celular puede encontrarse en el estroma de la médula ósea, en una proporción de 1 cada 34.000 células mononucleares aproximadamente, con una eficiencia de aislamiento cercana al 100 %. (Nardo et al., 2006). Se encuentran principalmente en esternón, costillas, vértebras y huesos iliacos (López, 2009). Sin embargo este es un procedimiento altamente invasivo con riesgo de infección y doloroso para el paciente, y con la desventaja que el número de células de la médula ósea así como su potencial de diferenciación disminuyen con la edad (Kern et al., 2006) (Hass et al., 2011) (Chen et al., 2011).

3.2.3. Células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo

Las células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo, conocidas por sus siglas en inglés ASC (*Adipose Stem Cells*) comparten muchas características con sus homólogas de la médula ósea (conocidas también por las siglas BMSC, *Bone Marrow Stem Cells*), incluyendo un extenso potencial de proliferación y la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares como el osteogénico, adipogénico y condrogénico (Strem et al., 2005) (Yang et al., 2005).

El tejido adiposo ha mostrado tener una densidad de células madre 100 veces mayor a la obtenida de la médula ósea (Fraser et al., 2006). Experimentos *in vitro* han mostrado que células adiposas pueden ser inducidas a diferenciarse a células de varios linajes, inclusive cardiomiocitos (Barnet et al., 2011).

El aislamiento de células madre mesenquimales del tejido adiposo subcutáneo es un método menos invasivo que el de la médula ósea, obteniéndose a partir de una liposucción una mayor cantidad de tejido y de células. Se ha podido determinar que los protocolos de aislamiento de células madre mesenquimales de tejido adiposo son altamente específicos, ya que presentan una baja contaminación con otras líneas celulares. (Estrada et al., 2007)

En un estudio con ratas, Lee et al. en 2003 demostraron la formación *in vivo* de tejido adiposo y, por primera vez, la formación de hueso, implantando subcutáneamente injertos de ácido poliglicólico sembrados con células madre adiposas previamente diferenciadas *in vitro* a osteoblastos y adipocitos.

3.2.4. Células madre procedentes de cordón umbilical

La gelatina de Wharton del cordón umbilical contiene tejido conectivo y células fibroblastoides. En 2004 Wang et al. obtuvieron células mesenquimales aisladas de cordón umbilical que expresaban receptores CD44, CD105, CD 29 y CD51 y no expresaban CD34 y CD45, dato incluido a partir de 2006 como criterio de caracterización de MSC. Estas células pueden ser expandidas en cultivo y ser inducidas a formar distintos tipos celulares lo que podría sugerir una nueva fuente para terapias regenerativas. Al ser una fuente de tejidos adultos como todas las células mesenquimales, ayuda a evitar varios problemas éticos y técnicos (Wang et al., 2004).

Se han realizado estudios comparativos de las MSC de cordón umbilical con las de médula ósea mostrando que comparten las características de las MSC y que poseen respuestas similares al ser inducidas a la diferenciación e incluso tienen una plasticidad comparable hacia el linaje neuronal (Datta et al., 2011). Zeddou et al. en 2010 compararon las células de la matriz de cordón umbilical con las de la sangre del cordón. Utilizando varios métodos de aislamiento y cultivo en ambos tipos celulares encontraron que las dos se diferenciaban a adipocitos, osteocitos y hepatocitos y que presentaban los antígenos de superficie CD105+, CD90+, CD73+, además vieron que las MSC provenientes de la matriz del cordón umbilical mostraban ser una fuente mucho más abundante y con un mayor potencial de expansión que las de la sangre de cordón. Conjuntamente con las ventajas encontradas suponen una fuente no invasiva de MSC (Zeddou et al., 2010).

3.2.5. Células madre mesenquimales procedentes de pulpa adulta

Por primera vez en el año 2000 Gronthos et al. aislaron células madre mesenquimales de la pulpa dental humana adulta o DPSC (Dental Pulp Stem Cells). Este grupo dedujo que la pulpa dental podría contener también una población de células madre multipotenciales. Comparando las DPSC de terceros molares con las de médula ósea, observaron que las primeras exhibían una tasa de proliferación más alta.

Alge et al. en 2010 cultivaron DPSC y BMSC. Al realizar comparaciones cuantitativas revelaron que la población de DPSC tenía un crecimiento más rápido y un mayor porcentaje de células progenitoras, además de una mayor actividad de fosfatasa alcalina después de tres semanas en medio osteogénico. Estos resultados indican una mayor diferenciación hacia el linaje osteoblástico, lo que confirma trabajos previos de Yu et al. 2007 en cuanto a una mayor rapidez de crecimiento de las DPSC que las BMSC y apoyan la posible utilización de DPSC para la regeneración de tejidos mineralizados.

Otros estudios que utilizaron pulpa dental de terceros molares mostraron alta proliferación y alta capacidad de formación de colonias con formación de nódulos calcificados; además la caracterización fenotípica mostró que se diferenciaron a odontoblastos, adipocitos, condrocitos y osteoblastos (Lindroos et al., 2008) (Angelova et al., 2010).

Existen varios marcadores que no se expresan de manera uniforme en las DPSC, lo que indica que esta población es diversa. La naturaleza heterogénea de las DPSC puede reflejar la existencia de células en diferentes estadios de desarrollo o puede incluso indicar la presencia de diferentes linajes celulares pulpaes (Lindroos et al., 2008).

3.2.6. Células madre mesenquimales procedentes de pulpa temporal

Miura et al. en 2003 aislaron por primera vez células madre de la corona remanente de dientes temporales exfoliados, denominándolas SHED (Stem cells from human exfoliated deciduous teeth). Al compararlas con las células madre mesenquimales de médula ósea y de pulpa dental adulta, las SHED demostraron una tasa de proliferación mayor.

Las SHED tienen la capacidad de inducir formación ósea, generar dentina y diferenciarse en otros tejidos mesenquimales no dentales *in vitro* (Grontos et al., 2002), lo que sugiere que sean una fuente muy útil de células madre para tratamientos regenerativos (Angelova et al., 2010). La principal ventaja de utilizar células madre mesenquimales de pulpa dental temporal es que pueden obtenerse de una forma no invasiva a partir de piezas dentales temporales (Nakamura et al., 2009).

Muchos de estos datos aportan evidencias de que las células madre mesenquimales pueden contribuir a la regeneración de tejidos mediante diferentes acciones, entre ellas las siguientes:

1. Diferenciación en células del tejido dañado.
2. Asentamiento en el tejido lesionado con emisión de señales que favorezcan el reclutamiento en ese sitio de otras células progenitoras que participen en la regeneración de los tejidos.
3. Liberación de moléculas solubles con efectos autocrinos/paracrinos.
4. Mantenimiento de su propia autorrenovación, proliferación y funciones.
5. Efecto antiinflamatorio.
6. Inhibición de la apoptosis.
7. Incremento de la vascularización del tejido dañado.
8. Citoprotección y estimulación de las células sanas presentes en la región lesionada, incluyendo las que pueden estar en un estado quiescente (Gnecchi et al., 2008).

4. Diferenciación celular

La plasticidad de las células madre permite controlar el proceso de diferenciación hacia distintos tipos celulares y tisulares para un mayor control de las condiciones experimentales, y ya se conoce un gran número de factores implicados en la diferenciación celular con los que dirigir la evolución de estas células (López, 2009).

Los grupos de investigación de Urist y Redi iniciaron en la década de los 60, los estudios de los factores osteoinductivos, que muestran que tienen efectos sobre la regulación fenotípica y la producción de matriz ósea por parte de los fibroblastos, condrocitos y osteoblastos (Peris et al. 1996).

Actualmente se sabe que la diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son Ihh (Indian hedgehog) y Shh (Sonic hedgehog). También es esencial el factor de transcripción Cbfa1 (core-binding factor α -1, también llamado Runx2) y los factores de crecimiento, entre ellos las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), que constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales (Peris et al. 1996).

Los factores de crecimiento son moléculas polipeptídicas que sintetizan las células, cuya misión general es transmitir señales entre unas células y otras para modular su actividad. Si bien el término «factores de crecimiento» se presta a confusión, ya que no todos afectan al crecimiento celular, está universalmente aceptado en sentido general, para referirse a aquellas moléculas que estimulan o inhiben la división celular, su diferenciación, la migración y expresión génica (Guerado et al., 2003). Entre los factores de diferenciación hacia osteoblastos (OB) se han reconocido los factores de crecimiento: transformante β (TGF- β : Transforming Growth Factor- β), insulínico (IGF), derivado de plaquetas (PDGF) y fibroblástico (FGF) (Guerado et al., 2003).

Los TGF- β constituyen una superfamilia en la que se incluyen las BMP. Se ha observado que los TGF- β estimulan la proliferación de células osteoprogenitoras, aumentan el porcentaje de colágeno e influyen en la maduración celular y síntesis de sus productos, como fibronectina, osteopontina, osteonectina, trombospontina, proteoglicanos y fosfatasa alcalina. Además, inhiben la activación y formación de nuevos osteoclastos por lo que el efecto global de los TGF- β es la acumulación de matriz extracelular y la síntesis de diversos receptores de adhesión celular o integrinas. Estas moléculas se almacenan en forma de complejos inactivos de elevado peso molecular que se disgregan antes de su activación (Peris et al., 1996).

Las BMP están directamente relacionadas con la condrogénesis y osteogénesis tanto *in vivo* como *in vitro*. Se han identificados diferentes BMPs en humanos a partir de la expresión de proteínas recombinantes (Peris et al. 1996). La BMP-2, BMP-4 y BMP-7 se expresan tanto en la osificación intramembranosa como endocondral. La presencia de estas proteínas en la reparación ósea y su capacidad osteoinductiva está probada por varios procedimientos experimentales (Guerado et al., 2003).

Para llevar a cabo los cultivos de células mesenquimales *in vitro* y tratar de lograr su diferenciación a otros tipos celulares, se debe brindar las condiciones medioambientales de concentración atmosférica de gases y de temperatura del incubador, así como soportes, sustratos, medios de cultivo y suplementos más adecuados para el desarrollo de los distintos tipos de células (Gil-Loyzaga et al., 2008).

En referencia a la diferenciación causada por la influencia del ambiente *in vitro* existen varios tipos de medios de cultivo, entre los cuales están:

- Los medios de mantenimiento: En donde sólo se desea que las células vivan y se multipliquen o expandan sin diferenciarse, por lo que no se le añade ningún producto que cause inducción hacia la diferenciación, pero sí antibióticos (penicilina-estreptomicina) para evitar la contaminación de los cultivos y suero fetal bovino como en todos los demás medios.

- Los medios de diferenciación: Tienen protocolos estandarizados en donde se agregan sustancias químicas extraídas o sintetizadas en laboratorio a un medio de cultivo para inducir la diferenciación de las células hacia otro tipo celular específico. *In vitro* puede conseguirse la diferenciación mediante la adición de diversos suplementos al medio de cultivo, por lo que tenemos medios comerciales que permiten la diferenciación a las tres estirpes potenciales de las MSC. Los medios de diferenciación osteogénica están suplementados con ácido ascórbico, glicerofosfato y dexametasona. Los adipogénicos contienen indometacina, isobutil-metil-xantina, dexametasona, glutamina e insulina.
- Los medios condicionados: Son sustratos en los que se ha cultivado previamente células diferenciadas que liberan al medio componentes biológicamente activos con el fin de obtener tras la retirada de dichas células un medio en el que posteriormente se cultivará un tipo celular distinto al original.

4.1. Marcadores de diferenciación osteoblástica

A medida que las células madre se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. La expresión de Cbfa1/ Runx2 es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica, cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos (Fernández-Tresguerres et al., 2006).

El colágeno I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica (Fernández-Tresguerres et al., 2006).

La fosfatasa alcalina fue introducida en el medio clínico en 1929, fue el primer marcador bioquímico del remodelado óseo y permanece como uno de los más ampliamente usados en la práctica clínica. La ALP es una enzima localizada en las vesículas de la matriz extracelular como una proteína fijada a un glicolípido, inicia la mineralización en la superficie de estas vesículas y su función es hidrolizar fosfatos inorgánicos a partir de ésteres fosfóricos hacia el sitio de mineralización. Este fosfato será luego convertido en cristales de hidroxiapatita que produce la calcificación de las células (Fernández-Tresguerres et al., 2006) (Firriol et al., 2008).

4.2. Métodos para la identificación celular

Para analizar tipos celulares y la diferenciación de las células madre mesenquimales hacia varios linajes y específicamente OB se pueden aplicar distintas técnicas de identificación, algunas de ellas son:

Tinciones biológicas: Se pueden identificar OB por la presencia de fosfatasa alcalina o por detección de nódulos mineralizados de hidroxiapatita a partir de tinciones enzimohistoquímicas específicas para cada uno.

Citometría de flujo: Es una técnica de análisis celular que permite la medida simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. Mide las características de dispersión de luz que poseen los anticuerpos que se marcan con diversas moléculas conforme pasan las células a través de un haz de láser. Luego se obtienen los resultados en gráficas con base en parámetros definidos.

Sorting: La selección de células marcadas con fluorescencia es un método alternativo para aislar MSC. En esta técnica una población de células heterogéneas es caracterizada y separada según la intensidad de la fluorescencia que emitan. El citómetro aislará únicamente aquellas células cuya emisión de luz encuentra los parámetros definidos previamente. Las células según sean negativas o positivas para estos anticuerpos serán incluidas o excluidas de los tubos colectores. Un ejemplo es el

estudio de Chan y cols en 2011 en donde por sorting separan las MSC de las demás células de la pulpa dental previo al cultivo celular.

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa sirve para amplificar un fragmento de ADN. Su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con muy alta probabilidad, proteínas, virus o bacterias y demás organismos. Esta técnica permite tener muchas copias de los genes que codifican las proteínas más importantes involucradas en el proceso de biomineralización como sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina y osteopontina (OPN).

5. Alternativas para obtener la diferenciación celular

5.1. Cultivo en medios condicionados

En la literatura científica podemos encontrar varios ejemplos de utilización de medios condicionados aplicados sobre células madre o condicionados por estas. Pan et al. en 2008 aislaron células madre mesenquimales de la médula ósea de ratones y las cultivaron en medio de cultivo condicionado por hepatocitos en diferentes estados del desarrollo y a los 7 días encontraron que las células en cultivo expresaban un gen hepático así como cambios morfológicos propios de estas células (R-L Pan et al., 2008).

Hinze et al. en 2011 introdujeron células madre de médula ósea en medio condicionado por células gliales *in vitro*. Observaron que las células se diferenciaban a células de microglia primarias en sus características de fenotipo por expresión de marcadores específicos y por su función *in vivo* tras un trasplante sistémico de las mismas.

En otro experimento que observó los efectos paracrinós de las MSC reveló que el medio condicionado con estas células usado para el tratamiento de cardiomiocitos en isquemia incrementó el número celular y el contenido total de proteínas mostrando efectos hipertróficos (Xu et al., 2009). Esto concuerda con los estudios de Tang et al. y Dai et al. en 2005 que indican que las MSC transplantadas después de un infarto de miocardio ejerce cardioprotección por aumento en el tejido muscular y mejora en la función cardíaca.

También Baer et al. en 2009 prepararon un medio de cultivo condicionado a partir de células epiteliales renales de los túbulos proximales y sembraron MSC derivadas de tejido adiposo. Analizando la morfología y expresión de marcadores específicos se indujo significativamente a la proliferación de las células de origen adiposo después de 12 días de incubación, por lo que concluyeron que los factores solubles provenientes de las células renales tubulares inducen la diferenciación de las MSC.

5.2. Co-cultivo celular

El co-cultivo celular es una técnica que permite el cultivo de dos tipos celulares distintos en un mismo sistema. Una forma de co-cultivo muy utilizada es la que separa las distintas células con un “insert” (cestillo o membrana de policarbonato), de forma que las células que son cultivadas a uno y otro lado de la membrana no pueden entrar en contacto debido al escaso tamaño del poro, pero sí permite el paso del medio de cultivo y de factores solubles a ambos lados de la membrana.

Schiller et al en 2009 realizaron un co-cultivo para examinar las interacciones paracrinas entre células óseas y células tumorales de sarcoma. Evaluaron un modelo de co-cultivo que permitía monitorear la expresión, liberación y regulación de factores paracrinicos durante las interacciones entre un fémur intacto y las células tumorales, encontrando un sinergismo que aumentaba la expresión de ciertos marcadores en ambos tipos celulares.

En 2010, Leonard et al. cultivaron enterocitos, monocitos y células dendríticas en un sistema tridimensional logrando simular la reacción inflamatoria del epitelio intestinal. También Sun et al. en 2007 realizaron un experimento en donde co-cultivaron MCS con células vasculares endoteliales en una matriz compuesta de ácido poliláctico y poliglicólico logrando buenos resultados en la inducción de formación de hueso vascularizado *in vivo* en ratas.

Otro ejemplo de co-cultivo es el realizado por Morrison et al. en 2011 en donde cultiva osteoblastos con células provenientes de cáncer de seno en donde demuestran que estas últimas alteran el microambiente donde se encuentran, perturbando la red de señales y alterando muchas moléculas bioactivas. También se han cultivado MSC con células madre hematopoyéticas en donde se ha encontrado un aumento en la viabilidad y la proliferación de estas últimas (Lazar-Karsten et al., 2011).

La capacidad de las células diferenciadas proximales y de los productos liberados al medio de cultivo *in vitro* para producir cambios en las MSC, nos ha llevado a pensar que podría ser similar a los procesos fisiológicos de actividad paracrina. Por este motivo hemos diseñado un estudio en donde se han cultivado MSC provenientes de distintos tejidos: tejido óseo, pulpar, adiposo y umbilical, utilizando dos sistemas de cultivo: 1. El co-cultivo celular de OB y MSC con cestillos y 2. El cultivo de las MSC en medio condicionado por OB para conocer la influencia del medio sobre la plasticidad o capacidad de diferenciación de las MSC.

6. Hipótesis

Todos estos estudios nos hacen pensar que:

El ambiente tiene una influencia determinante en la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales.

7. Objetivo General

Determinar la posibilidad de conseguir la diferenciación de células madre mesenquimales de pulpa dental temporal, pulpa adulta, tejido adiposo, cordón umbilical y tejido óseo mediante su cultivo en medio modificado por osteoblastos.

7.2. Objetivos específicos

1. Determinar la expresión de fosfatasa alcalina de células madre mesenquimales de los distintos orígenes mediante la aplicación de medio de cultivo condicionado por osteoblastos.
2. Comprobar la actividad de la fosfatasa alcalina mediante el co-cultivo de células madre mesenquimales con osteoblastos.
3. Evaluar los depósitos de hidroxapatita en células madre mesenquimales de los distintos tejidos con medio condicionado por osteoblastos.
4. Evaluar los depósitos de hidroxapatita en células madre mesenquimales en co-cultivo con osteoblastos.

8. Materiales y métodos

Todos los procedimientos del presente experimento se realizaron en el Laboratorio de Ingeniería tisular de la facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Materiales

Equipo de laboratorio:

- Pipetas.
- Placas de Petri.
- Tubos Falcon de 10 ml y 50 ml.
- Filtros.
- Frascos de cultivo: T75 (75 cc), T25 (25 cc).
- Placas multipocillo multiwell.
- Cestillos Insert para co-cultivo (Nalgene Nunc International Corp, USA)
- Nevera a 4°C y -20°C y -80 °C.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio de fluorescencia.
- Microscopio óptico invertido Leica con cámara fotográfica.
- Balanza.
- Baño termoestabilizado.
- Campana de flujo laminar horizontal. (Streamline®)
- Centrífuga Universal 320 R 3Hettich® con rotor de ángulo fijo.
- Incubadora de CO₂ con atmósfera humidificada de CO₂ al 5% a 37° de temperatura (CO₂CELL, MMM-Group)

Reactivos para el cultivo celular

- Medio de cultivo α -MEM.
- Medio de cultivo α -MEM reconstituido (Minimum Essential Medium Eagle: α -MEM, 0.5% L-Glutamina, 1% antibiótico y 15% suero fetal bovino, de la casa Sigma-Aldrich).
- Medio de diferenciación adipogénica: dexametasona, insulina, isobutil metil xantina e indometacina.
- Medios de cultivo para la diferenciación osteogénica de la casa Sigma-Aldrich®.
- Solución balanceada de Hanks 10X (HBSS: Hanks Balanced Salt Solution) (Sigma-Aldrich).
- PBS (Phosphate Buffered Saline): solución salina tamponada.
- Solución de Tripsina-EDTA 1X (Sigma-Aldrich).
- Osteoblastos humanos de la casa comercial LONZA NHOst 14929. Lot 6F4360.
- Tinción red oil.
- Kit de tinción fluorescente para Hidroxiapatita (Osteomalge, LONZA mineralization assay Lot #: 0000255903).
- Kit de tinción para fosfatasa alcalina. (Sigma-Aldrich, BCIP/NBT liquid substrate system).
- Líneas celulares de trabajo: pulpa temporal, pulpa adulta, tejido adiposo, cordón umbilical y explante óseo.

Métodos

8.1. Aislamiento y cultivo de las células madre mesenquimales (MSC)

El aislamiento de las distintas MSC se llevó a cabo según el procedimiento establecido para cada tejido. El tejido adiposo subcutáneo se obtuvo de una liposucción realizada a un paciente sometido a cirugía estética en un centro especializado y su aislamiento se realizó en base al protocolo de Weinzierl et al. 2006. Las células madre de pulpa dental fueron extraídas de un tercer molar y de 2 caninos temporales y su obtención y aislamiento se realizó en base al protocolo de Gronthos et al. 2002. Las MSC de tejido óseo se extrajeron de una cirugía de cordales y para la obtención de todas las células madre se utilizaron métodos enzimáticos de separación. En todos estos tejidos se realizó fragmentación y digestión tisular mediante inmersión en colagenasa, luego fueron centrifugados y posteriormente el sedimento obtenido fue sembrado en frascos de 75cc con MEM reconstituido. Los cultivos se mantuvieron en la incubadora de CO₂ a 37° C. El aislamiento de las células de cordón es una modificación del método descrito por Wang et al., 2004, que consiste en retirar los vasos del cordón, cortar la gelatina en pequeños fragmentos e incubarlos con colagenasa al 0.15% y hialuronidasa al 0.1% en agitación durante 6 horas a 37°C, se cultivan con alfa MEM y al día siguiente se retiran las células y restos no adheridas al plástico. Para la utilización de los linajes celulares humanos se obtuvo el permiso del comité de ética del Hospital Clínico de Madrid y de la Fundación Hospital de Alcorcón.

Los procedimientos anteriores se realizaron en un experimento previo de nuestro grupo de investigación en donde se determinó el perfil inmunocitoquímico para caracterizar cada población de MSC según su procedencia. Se realizó la caracterización de las células mediante citometría de flujo utilizando los marcadores de membrana que aconseja la sociedad internacional de células madre. Los resultados fueron coincidentes con los criterios establecidos para MCS, concluyendo que los tejidos conseguidos en el experimento son fuentes fiables de obtención de MSC mostrando cierta heterogeneidad entre los diferentes linajes (Jalil, 2012).

Una vez obtenidas y caracterizadas las células madre en el estudio previo, comenzamos el presente experimento con la siembra de MSC para su expansión, en donde se utilizó el método de cultivo estacionario o en monocapa (Gil-Loyzaga, 2008). Las células se sembraron según su origen, en 10 ml de medio de cultivo α -MEM reconstituido como medio de mantenimiento dentro de frascos plásticos de 75cc.



Fig.3. Frascos de cultivo de 75cc con las MSC en medio de mantenimiento.

Los frascos se colocaron en la incubadora en condiciones estándar de cultivo: atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y a 37°C de temperatura, siendo la condición de hipoxia un parámetro crítico en la capacidad de diferenciación de las MCS (Basciano, 2011). Todos los procedimientos de manipulación celular y de medios se realizaron bajo la campana de flujo laminar horizontal para garantizar su esterilidad.

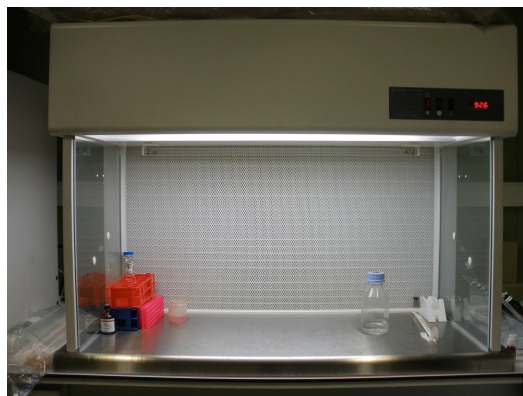


Fig.4. Campana de flujo laminar horizontal del laboratorio de Ingeniería de tejidos.

Los cultivos se mantuvieron en la incubadora y el medio fue cambiado cada 2 a 3 días. El crecimiento celular fue controlado mediante su observación en el microscopio óptico invertido. Cuando las células alcanzaron confluencia (70-90% de la superficie) se procedió a subcultivarlas con el fin de expandir el cultivo celular, este procedimiento se describirá a continuación.

Las células adheridas a los frascos de cultivo fueron levantadas por el método de tripsinización. Para ello, se retira con la pipeta electrónica el medio de cultivo reconstituido, se lavan las células dos veces con solución balanceada de Hanks para evitar que el medio inactive la tripsina. Seguidamente se le añade 5ml de tripsina manteniéndose de 7 a 10 minutos en la incubadora de CO₂ al 5% y a 37°C de temperatura para conservar su efectividad.



Fig.5. Incubadora de CO₂.

El contacto con la tripsina durante este periodo de tiempo provoca que las células se despeguen del fondo del frasco de cultivo. (Gil- Loyzaga, 2008).

Se pudo observar en el microscopio óptico invertido un cambio morfológico en las células, en el cual pasaron de una forma alargada o fibroblastoide a una forma redonda cuando se encontraban flotando en el medio, como vemos en la figura 6.

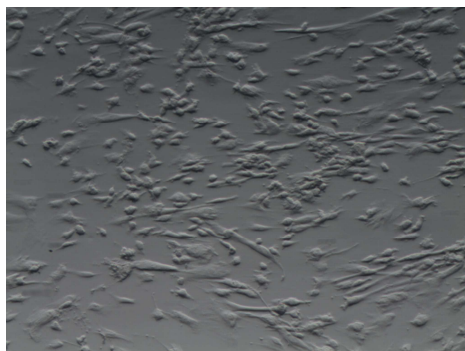


Fig.6. Cambio morfológico celular durante la tripzinización.

Seguidamente la tripsina fue inactivada con alfa-MEM reconstituido, posteriormente se trasladó con pipeta el contenido del frasco a tubos Falcon de 10ml. Las muestras fueron centrifugadas a 1800 rpm durante 10 minutos a 4°C; el sedimento obtenido se diluyó en el medio reconstituido y las células se sembraron a una menor concentración para continuar con su crecimiento o expansión. Todas la MCS utilizadas en el actual experimento se encontraban entre el 3^{er} y 5^{to} subcultivo (pase).

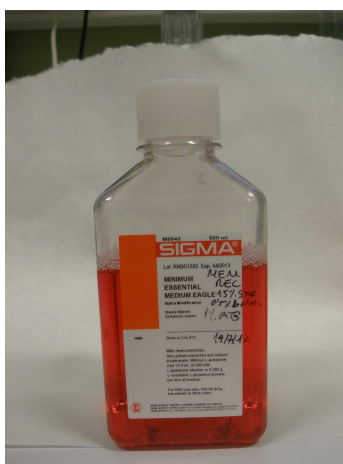


Fig.7. Medio de cultivo α -MEM de SIGMA.

Una vez expandidas las células, realizamos dos tipos de cultivos celulares distintos para conocer la influencia del medio modificado por OB sobre las células madre mesenquimales:

1. Siembra o cultivo de las MSC en medio condicionado por OB.
2. Realización de co-cultivo celular de OB con MSC.

8.2. Cultivo de células diferenciadas y obtención del medio condicionado

Se utilizó una línea comercial de osteoblastos humanos de hueso sano de la casa comercial LONZA como células diferenciadas. Estos OB se cultivaron en frascos de 25cc y aunque la casa aconseja un medio específico para el cultivo y mantenimiento de los osteoblastos se quiso comprobar su respuesta al medio de mantenimiento α -MEM con el fin de evaluar la posibilidad de obtener medio condicionado. Para ello se realizó una curva de crecimiento con una población de OB en medio α -MEM reconstituido. Se sembró una línea de 6 pocillos en una placa multiwell de 24 compartimentos con 10^4 células por cm^2 de las líneas de OB, ASC y de BMSC. Cada 48 horas se procedió a levantarlas con tripsina y a realizar un recuento de las mismas para así obtener la media de la proliferación celular de los pocillos para cada línea. Para este cálculo se utiliza bajo el microscopio óptico invertido la cámara de Neubauer en la cual se deben ver de 3 a 5 células por cada una de las cuadrículas principales en las que se divide la cámara.



Fig.8. Cámara de Neubauer para conteo celular.

Esta curva de crecimiento se realizó para verificar que el incremento de las células era coincidente con el del medio específico para OB de la casa comercial. Al corroborarlo se sustituyó todo el medio de crecimiento comercial en el que venían los OB por α -MEM reconstituido.



Fig.9. Frascos de cultivo de 25cc.

Posteriormente para la obtención del medio condicionado, se retiró el medio de cultivo de los OB cada segundo día con la pipeta y se trasladó a un frasco estéril y totalmente cerrado conservándose en la nevera a 4°C hasta el día del cultivo de las MSC. Esto permite mantener los nutrientes del medio así como los posibles factores de acción paracrina pero impide la viabilidad de posibles células osteoblásticas que podrían ser origen de falsas positividades por causas como la fusión celular. A los OB se les volvió a añadir nuevo medio de mantenimiento reconstituido y fueron colocados en la incubadora.



Fig.10. Extracción del medio condicionado por OB.

8.2.1. Cultivo de células madre en medio condicionado

Se realizó el subcultivo de las MSC de explante óseo, cordón umbilical, tejido graso, pulpa adulta y dos líneas de pulpa temporal en placas de 24 pocillos y fueron cultivadas durante 24h en medio de mantenimiento para que se pegaran al fondo de la placa. En cada placa se sembró una línea de 6 pocillos de cada estirpe de procedencia.

Las MSC se cultivaron a una concentración óptima de 3×10^3 células por cm^2 . Una vez que las células se han adherido al fondo del frasco se inicia el proceso de cultivo con la utilización del medio condicionado. Cada 2 días se reemplazó este medio de cultivo retirado de los OB y mantenido en la nevera, por nuevo medio condicionado. Este proceso se llevó a cabo durante 4 semanas.



Fig.11. Subcultivo de las MSC en placas de 24 pocillos.

Simultáneamente realizamos como control el cultivo de las MSC en placas con medios de diferenciación comercial osteogénico y adipogénico para comprobar la diferenciación celular (controles positivos), y en medio de mantenimiento para ver si continuaban indiferenciadas y comprobar que son MSC (controles negativos). También los osteoblastos comerciales se usaron como control de los niveles de fosfatasa alcalina e hidroxipatita.

Los controles se realizaron para comprobar si las células tenían capacidad de diferenciación; las MSC sembradas en medio comercial para diferenciación osteogénica y adipogénica deberían diferenciarse en osteoblastos y adipocitos respectivamente, y las sembradas en medio de mantenimiento deberían continuar indiferenciadas.

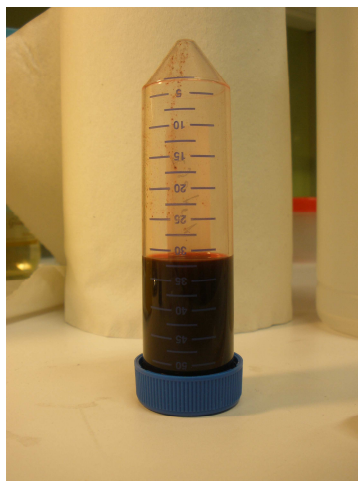


Fig.12. Tinción para linaje adipogénico, Red oil.

A las 4 semanas de cultivo se efectuaron las pruebas con los marcadores de diferenciación celular tanto a los cultivos experimentales como a los controles positivos y negativos.

8.3. Co-cultivo celular de MSC con osteoblastos

Se realizaron co-cultivos de células madre mesenquimales con células osteoblásticas utilizando el sistema de cestillos porosos “insert” que permite el co-cultivo de dos tipos celulares separados por una membrana de policarbonato que conforma el cestillo, de manera que las células que son cultivadas a uno y otro lado de la membrana no pueden entrar en contacto debido al escaso tamaño del poro.



Fig. 13. Sistema tipo insert. Se puede apreciar fuera de la placa la membrana o cestillo que se inserta separando los dos tipos celulares.

Para nuestro estudio utilizamos cestillos de 0.1 μ m de poro, que permite el paso del medio de cultivo y de factores solubles a ambos lados de la membrana pero no de células. En este cestillo se sembraron los osteoblastos y se dejaron proliferar 5 días. Posteriormente en el fondo del pocillo se cultivaron las MSC. A ambos lados de la membrana se adicionó medio de mantenimiento. Para este proceso de co-cultivo se utilizaron dos líneas distintas de SHED, una de DPSC y una de ASC.

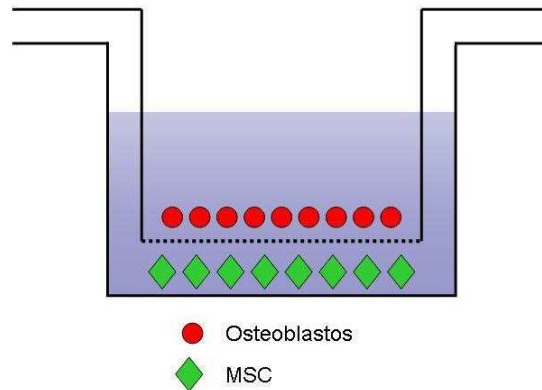


Fig.14. Esquema del co-cultivo de OB con MSC usando el sistema insert.

8.4. Determinación de marcadores de actividad osteoblástica

Fosfatasa Alcalina

A las 4 semanas de cultivo se realizaron las tinciones de los marcadores osteoblásticos, tanto a las MSC cultivadas en medio condicionado por OB como las sembradas en co-cultivo. Para la utilización de la fosfatasa alcalina (ALP) se utilizó el kit de tinción para ALP (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante. Previo a la tinción, las células fueron fijadas. Para ello se retira el medio de cultivo y se lava cada pocillo con PBS (2 veces) y se retira. Luego se agrega 2 ml de formaldehído al 10% durante 5 minutos a temperatura ambiente y se retira para luego lavarlas 2 veces más con PBS durante 10 minutos.

Se aplicó la tinción con gotero a cada uno de los pocillos y se observaron al microscopio óptico. En el caso del co-cultivo se realizó sólo la tinción de la fosfatasa alcalina.

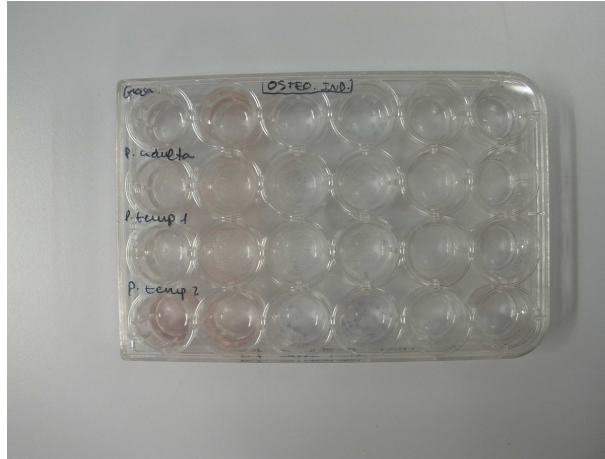


Fig.15. Placa de 24 pocillos marcada con cada línea celular.

Hidroxiapatita

Las células fueron fijadas de la misma forma que para la fosfatasa alcalina. Para la evaluación de la hidroxiapatita se utilizó la tinción fluorescente Osteolmage de LONZA siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tinción se basa en la adhesión específica del agente fluorescente a la porción de la hidroxiapatita como la depositada en los nódulos óseos por las células y se puede hacer una rápida evaluación cualitativa por microscopía de fluorescencia donde se observaría la HA de color verde fluorescente.

9. Resultados

Se realizó una curva de crecimiento con una población de OB comerciales, de BMSC y de ASC en medio alfa-MEM reconstituido. Esta prueba se hizo para verificar si el crecimiento de las células en este medio era coincidente con el crecimiento en medio específico para OB de la casa comercial, ya que el alfa-MEM es el sustrato utilizado para sembrar todos los tipos celulares. Al corroborar que las células crecen de la misma forma en ambos medios, se sustituyó todo el medio de crecimiento comercial en el que venían los OB por alfa-MEM reconstituido.

En la figura vemos la curva de crecimiento de las MSC de tejido graso, explante óseo y osteoblastos comerciales en medio alfa-MEM reconstituido utilizadas para conocer la proliferación celular. Se utilizó la cámara de Neubauer para el conteo de las células.

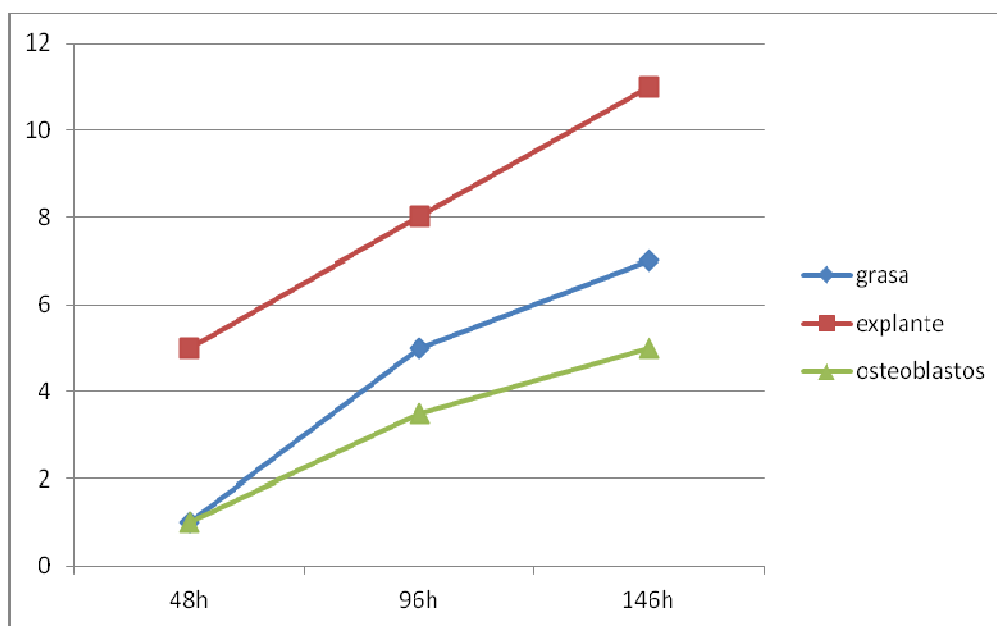


Fig. 16. Curva de crecimiento celular. Eje X tiempo de cultivo, eje Y n de células x 10000/ml.

9.1. Fosfatasa alcalina

Todas las células sometidas al medio condicionado por OB se mostraron positivas a la fosfatasa alcalina, tiñéndose de color azul. Esta tinción se pudo observar a simple vista y además se realizaron fotografías con el microscopio óptico para apreciar la tinción en los cuerpos celulares. Adicionalmente se evidenció un cambio en la morfología celular donde las células pasaron de una forma fibroblastoide alargada en los cultivos primarios a una forma poligonal y de mayor tamaño después del cultivo en el medio condicionado como vemos en las figuras 17 y 18.

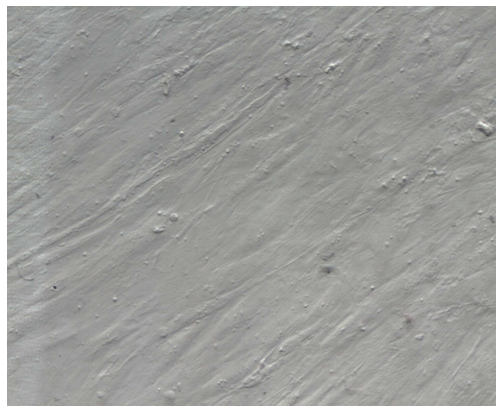


Fig.17. MSC de pulpa adulta antes de cultivarlas en medio condicionado (20X).

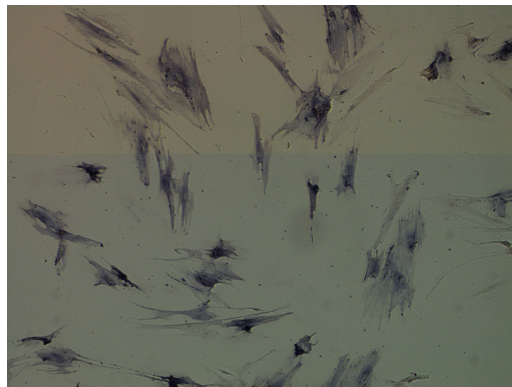


Fig.18. MCS de médula ósea diferenciadas a OB después del cultivo en medio condicionado. Se aprecia el color azul de la tinción de fosfatasa alcalina y la forma estrellada de las células (10x).

Las MSC procedentes de pulpa dental temporal presentaron la actividad más alta de fosfatasa alcalina, seguidas por las de pulpa adulta, tejido adiposo y óseo, y con menos actividad las de cordón umbilical, figura 19. Se sembró una columna para cada línea celular en la placa de 24 pocillos. Las dos primeras filas se utilizaron para la tinción de la HA. Las columnas de la derecha aparecen con una cruz indicando que no se evaluaron por haberse producido una contaminación posiblemente con micoplasma, figura 20.

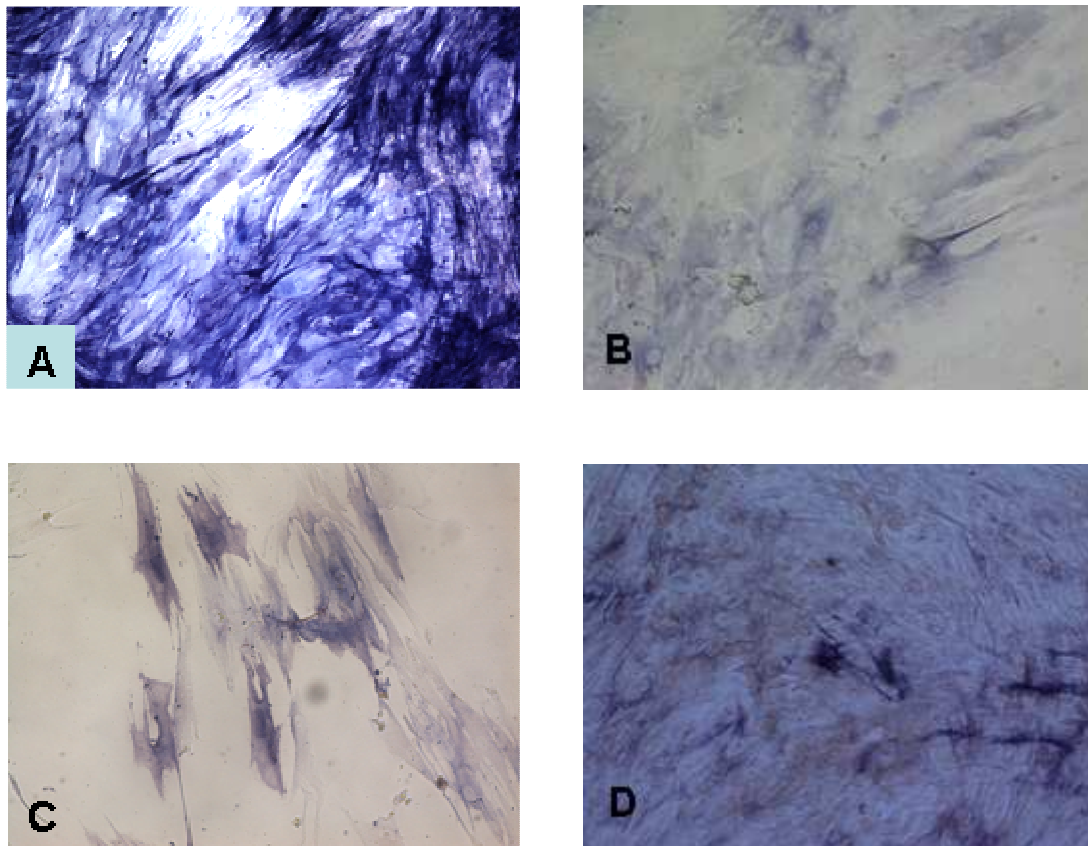


Fig.19. MSC de los distintos tejidos sometidas al medio condicionado por OB. Se aprecia el color azul de la fosfatasa alcalina en las células diferenciadas a OB. A) Células pulpa temporal SHED (10x), B) Células grasa ASC (20x), C) Células explante óseo BMSC (20x), D) Células de cordón umbilical (10x).

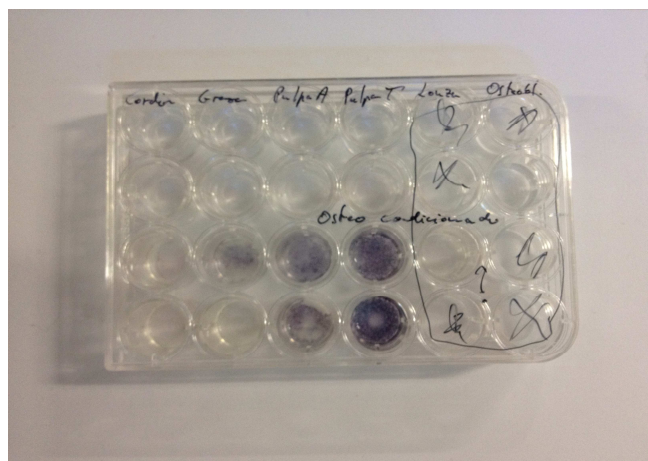


Fig.20. MSC teñidas con fosfatasa alcalina después de 4 semanas de cultivo en medio condicionado por OB.

Los controles negativos de cada uno de los tipos celulares que se sembraron con medio de mantenimiento dieron negativo a la actividad de fosfatasa alcalina, por lo tanto no hubo tinción celular. Al mismo tiempo no se encontraron cambios en la morfología ni el tamaño celular, que era lo esperado en células indiferenciadas.

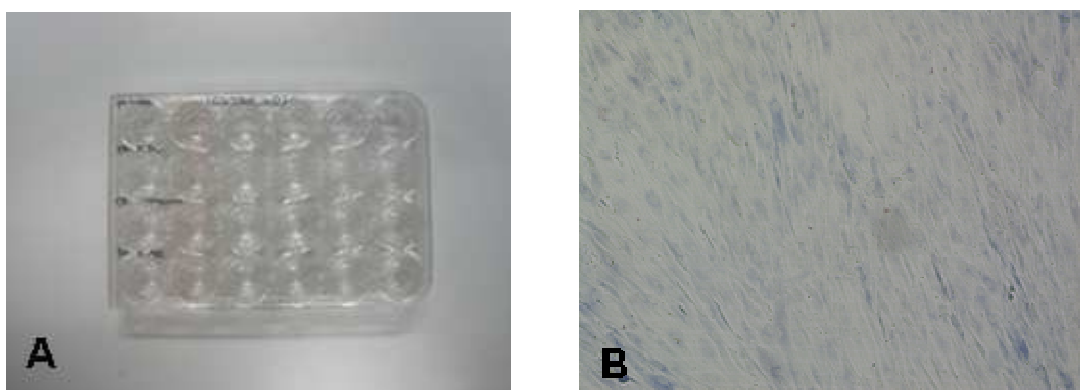


Fig. 21. A) Control negativo de MSC en medio de mantenimiento con tinción de fosfatasa. B) MSC de tejido adiposo indiferenciadas (10x). Se aprecia que las células indiferenciadas no son teñidas.

Los controles positivos que se sembraron con medio para diferenciación osteogénica expresaron actividad positiva de fosfatasa alcalina y los controles cultivados en medio de inducción adipogénica mostraron vacuolas lipídicas al teñir la muestra con red oil, que es una tinción específica para marcaje de células adiposas. Estos cambios fenotípicos fueron observados a simple vista y bajo el microscopio óptico como vemos en las figuras 22 y 23. Ambas manifestaciones evidencian que las células utilizadas en nuestro estudio conservaron la plasticidad característica de las

MCS al diferenciarse a osteoblastos y adipocitos con los medios inductores, además del marcaje antigénico inicial y su adherencia al plástico de los frascos de cultivo.

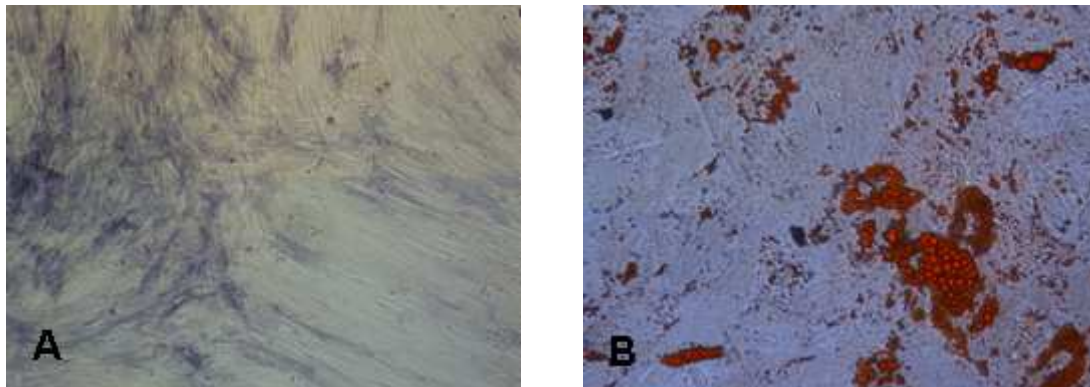


Fig.22. A) Control positivo de MSC de pulpa temporal en medio de diferenciación osteogénico y marcado con fosfata alcalina positiva (10x). B) Control positivo de MSC de tejido adiposo en medio de diferenciación adipogénico, se pueden observar las vacuolas lipídicas teñidas con red oil (40x).

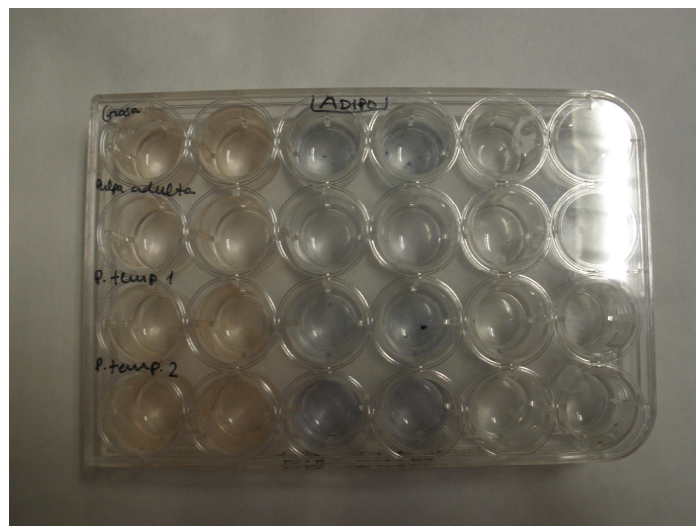


Fig.23. Controles positivos en medio de inducción osteogénico y adipogénico con red oil las dos primeras columnas y con fosfatasa alcalina las dos siguientes. Pocillos con MSC de grasa, pulpa adulta, pulpa temporal 1 y pulpa temporal 2.

El experimento realizado en co-cultivo celular utilizando los cestillos no logró la expansión de osteoblastos sobre la membrana requerida para su viabilidad. Los OB fueron insuficientes para condicionar el medio y provocar inducción por lo que no hubo diferenciación celular y las pruebas efectuadas a las MSC dieron negativas a la fosfatasa alcalina. Ante estos resultados negativos no fue necesario realizar la tinción con hidroxipatita.

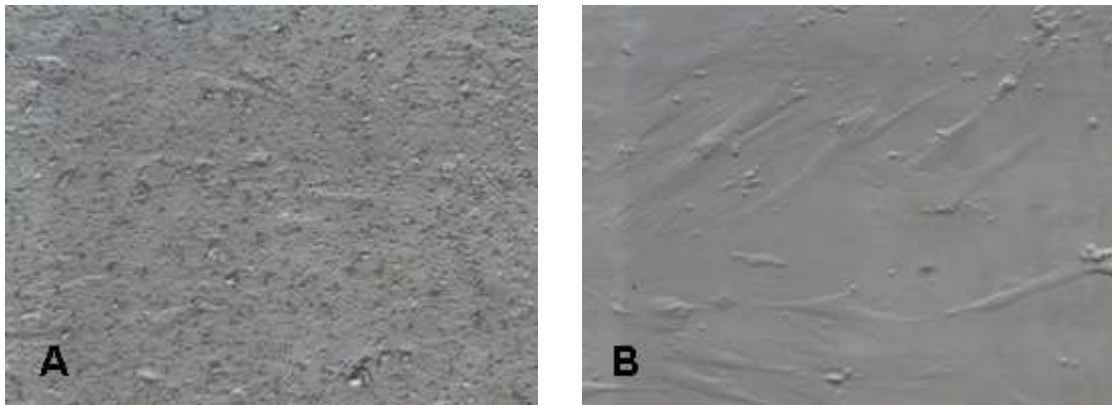


Fig.24. Co-cultivo celular observado bajo microscopio óptico invertido. A) Se observan los poros de la membrana y un reducido número de OB (20x). B) MCS de pulpa adulta indiferenciadas en el fondo del pocillo de co-cultivo (20x).

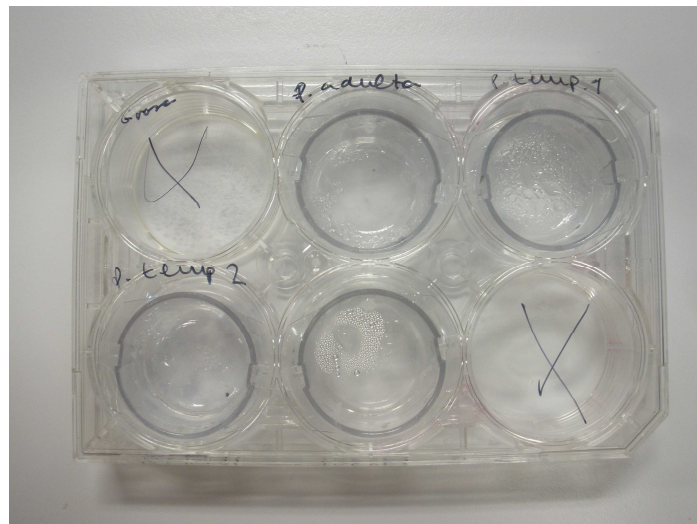


Fig.25. Co-cultivo de MSC con OB. Se puede ver que las células no fueron teñidas con la fosfata.

9.2. Hidroxiapatita

En los cultivos de las células madre mesenquimales sembradas en medio condicionado por OB también se pudo observar la presencia de nódulos mineralizados indicando la formación de hidroxiapatita, la cual fue visualizada en el microscopio óptico de fluorescencia, figura 26. La cantidad de formación mineral según el linaje celular coincidió con los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina. Ambas expresiones de estos marcadores demuestran la presencia de la enzima en las células diferenciadas a osteoblastos.

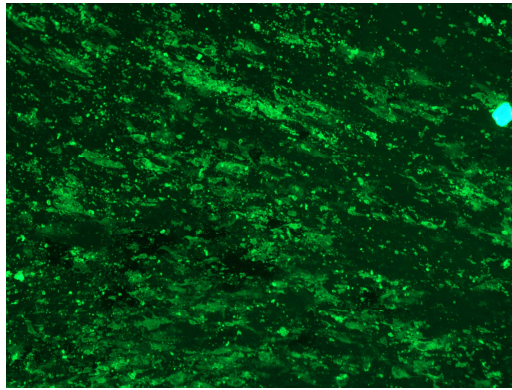


Fig.26. MSC de tejido graso en medio condicionado (10x). Se observa la fluorescencia color verde de la hidroxiapatita en los cuerpos celulares diferenciados.

Los controles negativos de las MSC utilizados para la tinción con hidroxiapatita dieron negativos en todos los tejidos como vemos en la figura 27.

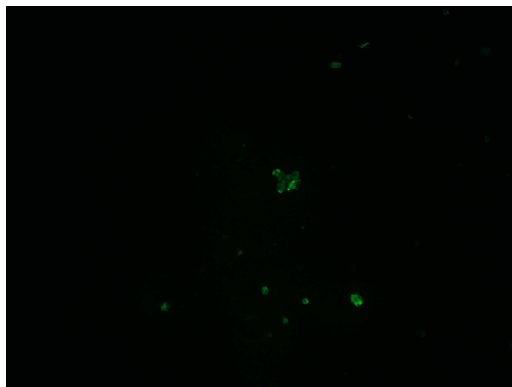


Fig.27. Control negativo de MSC de explante óseo (10x). Se observa una mínima fluorescencia de las células.

10. Discusión

La ingeniería tisular como campo multidisciplinario aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que pueden restaurar, mantener y mejorar la función de los tejidos (Shehab, 2009). La ingeniería de tejidos *in vitro* comprende la obtención de tejidos en el laboratorio para su posterior implantación en el sitio dañado (Yang et al., 2001).

Actualmente, el trasplante de células madre adultas es un método muy utilizado en distintas aplicaciones. Sin embargo, todavía no se conocen bien los mecanismos mediante los cuales las células trasplantadas podrían mejorar o promover la regeneración de los tejidos (Hernández et al., 2009). Se ha planteado la hipótesis de que factores solubles liberados por las células implantadas pueden desempeñar una acción esencial en la regeneración de los tejidos mediante un mecanismo paracrino que actúa estimulando a las células normales residentes en el sitio afectado (Reinisch et al., 2007).

Estudios experimentales han mostrado que la inyección en un sitio lesionado de medio condicionado mediante el cultivo de células madre adultas, puede producir efectos beneficiosos comparables a cuando el tratamiento se hace solo con células madre (Reinisch et al., 2007).

En el presente estudio se han cultivado MSC provenientes de tejido óseo, pulpar, graso y umbilical mediante dos sistemas de cultivo, el co-cultivo celular de OB y MSC, y el cultivo de las MSC en medio condicionado por OB para conocer la influencia del medio sobre la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales.

No encontramos estudios que hicieran cultivo de MSC en medio condicionado por OB específicamente por lo que no se pudo hacer una comparación directa de los resultados. Pero encontramos experimentos que utilizan MSC, medios condicionados y co-cultivos en donde buscaban la influencia de unos sobre otros. Como ejemplo el estudio de Hinze et al. en 2011 en donde introdujeron células madre de médula ósea en medio condicionado por células gliales y observaron que las MSC se diferenciaban a células de microglia.

Estudios recientes sobre células madre mesenquimales señalan que se han aislado a partir de varios tejidos adultos y han demostrado la formación de tejido óseo al ponerlas en contacto con el medio al que se desean diferenciar (Angelova et al., 2010) (Alge et al., 2010) (Lee et al., 2003) (Wang et al., 2004). En nuestro estudio pudimos comprobar mediante marcadores sobre las distintas líneas celulares y sus grupos control que el medio condicionado por OB tiene un efecto inductor de la diferenciación hacia la estirpe osteoblástica. Sobre las células madre de origen mesenquimal procedentes de pulpa dental temporal, pulpa dental adulta, tejido adiposo, médula ósea y cordón umbilical se detectó la presencia de fosfatasa alcalina e hidroxiapatita después de 4 semanas de cultivo en el medio condicionado.

La mayor expresión de fosfatasa alcalina e hidroxiapatita en células procedentes de tejido pulpar coincide con los hallazgos de Gronthos et al. 2002, Alge et al. 2010 y Lindroos et al. 2008 en donde encuentran que las MSC extraídas de pulpas de órganos dentales exhibían una tasa de proliferación más alta que las obtenidas de médula ósea. Al realizar comparaciones cuantitativas revelaron que la población de DPSC tenía un crecimiento más rápido y un mayor porcentaje de células progenitoras, además de una mayor actividad de fosfatasa alcalina después de tres semanas en medio osteogénico. También Miura et al. en 2003, al comparar las SHED con las células madre mesenquimales de médula ósea y de pulpa dental adulta, demostraron una tasa de proliferación mayor.

Además las diferencias en la cantidad de expresión de los marcadores utilizados concuerda con las conclusiones de Guzmán en el 2006, Hass et al. 2011, Wagner et al. 2005 donde dicen que dependiendo de su origen, las poblaciones de células madre aisladas muestran diferencias en su capacidad de proliferación y diferenciación.

En un estudio de Xu y colaboradores en 2005 indican que las células madre humanas cultivadas en medio condicionado por fibroblastos están sometidas a altos niveles de actividad de señalización de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) que se ha demostrado que inducen la diferenciación celular. La acción de estas proteínas puede ser una de las causas de la diferenciación de las MSC en nuestro experimento.

El experimento realizado en co-cultivo celular utilizando los cestillos no logró la expansión de osteoblastos sobre la membrana requerida para su viabilidad. Los OB fueron insuficientes para condicionar el medio y provocar inducción por lo que no hubo diferenciación celular y las pruebas efectuadas a las MSC dieron negativas a la fosfatasa alcalina.

Un factor importante en el cultivo de MSC es la contaminación de la muestra con células fibroblastoides del tejido conectivo. Esta contaminación constituye una variable biológica importante ya que podrían confundirse con MSC y causar una disminución del éxito en los experimentos de diferenciación tisular.

Sin embargo, los resultados mostrados por Chan et al. en 2011 para el estudio de producción de tejido mineralizado *in vivo* afirman que sólo dos tercios de la pulpa dental que fue purificada con sorting fue tan buena como las células no purificadas para la formación de tejido óseo. Por lo tanto separar las células indiferenciadas de las que no lo son por sorting previo al cultivo, no confiere ninguna ventaja para la proliferación y producción de tejido mineralizado (Chan et al., 2011). Por este motivo la no separación celular pudo haber sido adecuada para los propósitos de nuestro estudio.

Al utilizar células mesenquimales humanas pensamos en un posible tratamiento regenerador en el futuro utilizando células del propio paciente. Estas características celulares evitarían problemas de rechazo biológico y también problemas éticos a causa del tratamiento; y al hacer los cultivos en medios condicionados por células diferenciadas en lugar de medios químicos comerciales se disminuyen los costes de compra y se podría obtener diferenciación que se mantiene en el tiempo como dice Zurita et al. en 2007: *“Las células madre mesenquimales pueden diferenciarse in vitro, tanto por medio de agentes químicos, como por métodos biológicos... Hemos demostrado que la diferenciación por agentes químicos es reversible, volviendo las células mesenquimales a su fenotipo inicial, cuando eliminamos del medio los factores químicos que la habían inducido. Por el contrario, la diferenciación lograda por métodos biológicos es una diferenciación que se mantiene en el tiempo y que, de forma paralela, se acompaña de cambios electrofisiológicos que apoyan una auténtica diferenciación de la célula madre mesenquimal”*.

Hemos obtenido evidencia a favor de que las células madre mesenquimales pueden diferenciarse *in vitro*, tanto por medio de agentes químicos como por métodos biológicos siendo uno de ellos el cultivo en medio condicionado. En esta misma línea hemos podido demostrar la diferenciación en medio condicionado, por lo que descartamos la idea que se deba a un fenómeno de fusión celular y admitimos la gran importancia de los factores solubles que los osteoblastos pueden estar liberando al medio y que estimulan a las MSC al cambio fenotípico obtenido.

Estos resultados nos estimulan a continuar esta línea de trabajo en búsqueda de factores liberados en el medio, y asimismo profundizar en la utilización de los co-cultivos celulares.

11. Conclusiones

Según los resultados expuestos, obtenemos las siguientes conclusiones:

1. Los osteoblastos comerciales presentan una curva de crecimiento similar a la del medio comercial cuando se cultivan en medio α -MEM reconstituido con 0.5% L-Glutamina, 1% antibiótico y 15% suero fetal bovino.
2. Las MSC procedentes de las distintas líneas celulares utilizadas, expresaron actividad positiva de fosfatasa alcalina tras su cultivo con medio condicionado por osteoblastos siendo más intensa en las líneas procedentes de pulpa dental tanto temporal como adulta.
3. Se observaron depósitos de HA en las líneas de MSC sometidas al medio condicionado.
4. No consideramos evaluables los resultados del co-cultivo celular, debido a la baja proliferación de los osteoblastos sobre la membrana del sistema de cestillos.

El presente estudio demuestra que el medio condicionado por células diferenciadas en este caso osteoblastos, tiene una influencia determinante sobre la inducción hacia la diferenciación de las MSC de pulpa dental temporal, pulpa dental adulta, tejido adiposo, cordón umbilical y tejido óseo.

12. Bibliografía

Alge, Daniel L. “Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model”. *J Tissue Eng Regen Med* 2010; 4: 73–81.

Angelova, Ana. “Stem cell-based biological tooth repair and regeneration”. *Trends in Cell Biology*, Dec 2010; Vol 20, No 12.

Annalia Astia. “Improved cell growth by Bio-Oss/PLA scaffolds for use as a bone substitute”. *Technology and Health Care* 2008; 16: 401–413.

Baer. P.C. “Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells”. *Cell Prolif.* 2009; 42, 29–37.

Barnett Phil. “Cardiac regeneration: different cells same goal”. *Med Biol Eng Comput* 2011; 49:723–732.

Basciano et al. “Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status” *BMC Cell Biology* 2011; 12:12.

Bianco P, Robey PG. “Stem cells in tissue engineering”. *Nature* 2001; 414:118-21.

Bianco, Riminucci, Gronthos et al. “Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications”. *Stem Cells* 2001; 19:180-192.

Barradas, Yuan, Blitterwifk et al. Osteoinductive biomaterials: Current knowledge of properties, experimental model and biological mechanisms. *European cells and materials*. Vol 21, 2011; 407-429.

Bobis Sylvia, Jarocho D, Majka M. “Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications”. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006; 44(4):215-230.

Chan.B, Wong, K, Rabie.B. “*In vivo* production of mineralised tissue pieces for clinical use: a qualitative pilot study using human dental pulp cells”. Int. J. Oral Maxillofac. Surg, 2011; 40: 612-620.

Charlotte Morrison, Stephanie Mancini, Jane Cipollone, Reinhild Kappelhoff. “Microarray and Proteomic Analysis of Breast Cancer Cell and Osteoblast Co-cultures: Role of osteoblast matrix metalloproteinase (MMP)-13 in bone metastasis”. The Journal of Biological Chemistry September 30, 2011, vol 286, No. 39, pp. 34271–34285.

Chen Pei-Min, Men-Luh Yen, Ko-Jiunn Liu, “Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells”. Journal of Biomedical Science 2011; 18:49.

Cheneval D.R, J. Christy, D. Geiman, P. Cornelius. “Cell-free transcription directed by the 422 adipose P2 gene promoter: activation by the CCAAT/enhancer binding protein”. Proc. National Academy of Sciences USA 1991; 88:8465-69.

Dai WD, Hale SL, Martin BJ et al. “Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: Short- and long-term effects”. Circulation 2005; 112: 214–23.

Datta. Indrani, Swati Mishra, Lipsa Mohanty . “Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells”. Cytotherapy. September 2011, Vol. 13, No. 8, p 918-932.

Dominici, M, Le Blanc, K, Mueller. “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement”. Cytotherapy 2006; vol 8, no. 4, pp. 315-317.

Duplomb, L et al. “Concise Review: Embryonic Stem Cells: A New Tool to Study Osteoblast and Osteoclast Differentiation”. Stem cell 2007; 25, p544-552.

Estrada. C, Paz. AC, López. LE. “Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas”. Revista EIA, Junio 2006; Número 5 p. 93-100.

Estrada Roberto, Venegas Patricia. Comparación de diferentes protocolos para el cultivo de células madre mesenquimales de origen adiposo. Rev. costarric. cienc. méd , junio 2007; v.28 n.1-2.

Estrela, Carlos et al. “Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration”. Braz Dent J 2011; 22(2): 91-98.

Fernández Tresguerres Hernández-Gil et al. “Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo”. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11: E471-51.

Forriol F, Esparza R. “Tissue engineering: application of pluripotent stem cells in traumatology and orthopaedic Surgery”. Trauma Fund MAPFRE 2008; Vol 19 nº 2:88-101.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. “Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology”. Trends Biotechnol 2006; 24:150–154.

Friedenstein AJ, Gorskaja U, Kalugina NN. “Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs”. Exp Hematol 1976; 4:267-274.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. “Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues”. Transplantation 1968; 6:230-47.

García- Gómez, Gema Elvira, Zapata Agustin. “Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications”. Expert Opinion Biol October 2010; Vol. 10, No. 10, Pages1453-1468.

Gil-Loizaga, Pablo. “Cultivo de células y tejidos animales, Teoría y prácticas”. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 2008.

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau V. "Paracrine mechanism in adult stem cell signaling and therapy". *Cir Res* 2008; 103:1204-19.

Gronthos S, Brahimi J, Li W et al. "Stem cell properties of human dental pulp stem cells". *J Dent Res*, 2002; 81(8):531-535.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG. "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*". *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97(25):13625-30.

Guerado E, Díaz-Martín A, Arrabal MP, Cifuentes M. "Células madre e ingeniería tisular ósea: Bases celulares y perspectivas terapéuticas". *Rev ortop traumatol*, 2003; 47: 362-374.

Hass. Ralf, Cornelia Kasper, Stefanie Böhm. "Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC". *Cell Communication and Signaling* 2011, 9:12.

Hernández Ramírez. "Regenerating medicine related to the stem-cells and its mechanisms of action from adults cells". *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional* 2009; 25.

Hinze, Stolzing "Differentiation of mouse bone marrow derived stem cells toward microglia-like cells" *BMC Cell Biology* 2011; 12:35.

Hongchen Sun, Zhe Qu, Ying Guo. "*In vitro* and *in vivo* effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds". *BioMedical Engineering On Line* 2007, 6:41.

Hwai-Shi Wang, Shih-Chieh Hung. "Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord". *Stem Cells* dec 2004, Vol 22, Issue 7, p 1330–1337.

Isabel Fernández Tresguerres Hernández-Gil et al. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11: E471-51.

Jalil Daher. “Caracterización mediante citometría de flujo de diversas líneas celulares de origen mesenquimal para su aplicación en regeneración ósea”. Trabajo fin de master en ciencias odontológicas. Facultad de Odontología UCM. 2012.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M. “Cancer stem cells”. N Engl J Med 2006; 355:1253-61.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. “Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue”. Stem Cells, 2006; 24:1294-1301.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H. “Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue”. Stem Cells, 2006; 24:1294-1301.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. “Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation”. Arthritis Research & Therapy 2007; 9:204-14.

Lai, R.C, Choo, A. & Lim, S.K. “Derivation and characterization of human ESC-derived mesenchymal stem cells”. Methods in molecular biology 2011; vol. 698, pp. 141-150.

Lakshmipathy U, Verfaillie C. “Stem cell plasticity”. Blood Rev, 2005; 19:29-38.

Lazar-Karsten et al. “The influence of extracellular matrix proteins and mesenchymal stem cells on erythropoietic cell maturation”. Vox Sanguinis 2011; 101, 65–76.

Lee JA, Parrett BM, Conejero JA et al. "Biological Alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells". *Ann Plast Surg*, 2003; 50(6):610-617.

Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H. "Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts". *Biochem Biophys Res Commun*, 2008; 368: 329-335.

Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. "Engineering bone: challenges and obstacles". *J Cell Mol Med* 2005 January; 9(1):72-84.

López-Guerrero, José Antonio. "Células madre. La madre de todas las células". Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Ed. Hélice, 2da edición 2009.

Masías-Abraham. "Características y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales" *Rev Cub Hematol*. 2010; 26, 256-275.

M.J. Evans y M.H. Kaufman. "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos". *Nature* julio 1981; vol 292.

Ming Yan. "A Journey from Dental Pulp Stem Cells to a Bio-tooth". *Stem Cell Rev and Rep*, Mayo 2010.

Miura. Masaco, Gronthos Stan, Zhao Mingrui. "SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth". *Cell Biology* may 2003; vol. 100 no. 10, 5807-5812.

Mustapha Zeddou, Alexandra Briquet, Biserka Relic. "The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood". *Cell Biology International* 2010, 34, 693–701.

Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T. "Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp". *J Endod*, 2009; 35:1536-1542.

Nardo, NB. "Mesenchymal stem cells". *Handb Exp Pharmacol* 2006; p 174.

Payushina OV, Domaratskaya EI, Starostin VI. “Mesenchymal Stem Cells: sources, phenotype, and differentiation potential”. *Biology Bulletin*, 2006;33(1):6-25.

Peris J. L, J. Prat, R. Dejoz, M. Comin. “Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs): Efecto de la proteína osteogénica-1 (OP-1/BMP-7) en la condrogénesis y osteogenesis”. *Rev Esp Cir Osteoart* 1996; 31: 37-48.

Phil Barnett, Maurice J. B. van den Hoff. “Cardiac regeneration: different cells same goal”. *Med Biol Eng Comput* 2011, 49:723–732.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. “Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells”. *Science* 1999; 284:143-7.

Reinisch A, Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, et al. “Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application”. *Reg Med* 2007; 2:371-82.

R-L Pan, Y Chen. “Hepatic differentiation by fetal liver-conditioned medium”. *Cytotherapy* 2008; Vol. 10, No. 7, 668-675.

Rui-Xia Xu. “Mesenchymal stem cells promote cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* through hypoxia-induced paracrine mechanisms”. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2009; 36, 176–180.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K. “Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestin become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates”. *Blood* 2004; 104:2728-35.

Salgado A. J.; Coutinho O. P. and Reis R. L. “Bone tissue engineering: state of the art and future trends”. *Macromol Biosci* 2004 August 9; 4 (8):743-65.

Schiller Katherine R, Marion R Zillhardt, Jeremy Alley. “Secretion of MCP-1 and other paracrine factors in a novel tumor-bone coculture model”. *BMC Cancer* 2009, 9:45.

Stiehler, Maik. “Cancellous bone allograft seeded with human mesenchymal stromal cells: a potential good manufacturing practice-grade tool for the regeneration of bone defects”. *Cytherapy*. September 2010; Vol. 12, No. 5, P658-668.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I et al. “Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells”. *Keio J Med*, 2005; 54(3):132-141.

Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S. “Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation”, *Cell* 2007; vol. 129, no. 7, pp. 1377-1388.

Tang YL, Zhao Q, Qin XY et al. “Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction”. *Ann. Thorac. Surg.* 2005; 80: 229–37.

Tomoki Nampo. “A New Method for Alveolar Bone Repair using Extracted Teeth for the Graft Material”. *Journal of Periodontology* sep 2010; V 81, N 9.

Tontonoz, P.E, Hu, B.M. Spiegelman. “Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by mPPAR2, a lipid activated transcription factor”. *Cell* 1994; 79:1147-1156.

Tsai et al. “A feeder-free culture using autogeneic conditioned medium for indifferentiated growth of human embryonic stem cells: Comparative expression profiles of mRNAs, microRNAs and proteins among different feeders and conditioned media”. *BMC Cell Biology* 2010; 11:76.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, 2005; 33:1402-1416.

Wang, Hung, Peng. “Mesenchymal Stem Cells in the Wharton’s Jelly of the Human Umbilical Cord”. *Stem Cells* 2004; 22:1330–1337.

Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. “Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells”. *J Craniomaxillofac Surg*, 2006; 34: 466-471.

Xu. RH, RM Peck, DS Li. "Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells." *Nature Methods*, 2005.

Yang M, QJ Ma, GT Dang. "In vitro and in vivo induction of bone formation based on ex vivo gene therapy using rat adiposederived adult stem cells expressing BMP-7". *Cytherapy* 2005; Vol. 7, No. 3, 273-281.

Yang S, Leong K. F, Du Z, Chua C. K. "The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors". *Tissue Eng* dec 2001; 7(6):679-89.

Zapata. Agustín G. "Bioética e Investigación con Células Troncales". Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Salud Carlos III.

Zurita M., Aguayo C., Bonilla C. "Co-cultivo de celulas madre adultas mesenquimales y celulas de Schwann en presencia de membranas de policarbonato". *Patologia del Aparato Locomotor*, 2007; 5 (2): 103-109.